

## (54) METHOD FOR DETECTING MIXED AIR IN HERMETIC CONTAINER

(11) 63-138249 (A) (43) 10.6.1988 (19) JP

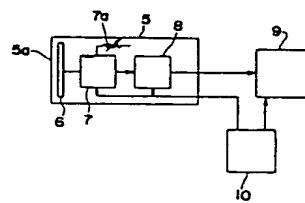
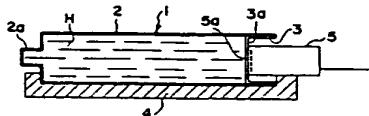
(21) Appl. No. 61-285616 (22) 28.11.1986

(71) SUNSTAR GIKEN K.K. (72) TAKESHI NAGATA(1)

(51) Int. Cl'. G01N27/22

**PURPOSE:** To detect with high accuracy whether mixed air exists in a hermetic container or not, by allowing the detecting part of the hermetic container to be opposed to the detecting surface of an electrostatic capacity sensor and detecting a variation of a capacitance.

**CONSTITUTION:** A normal cartridge 1 having no mixed air is installed to a supporting base 4, and in a state that the detecting surface 5a of a sensor 5 is abutting on the bottom face 3a of a plunger part, a regulator 7a is adjusted so that a display part 9 executes a display of "no air". Thereafter, the cartridge 1 for executing an inspection is installed to the supporting base 4, and by the sensor 5, the electrostatic capacity is detected. When mixed air exists in the cartridge 1, the influence exerted on the oscillating circuit of the sensor 5 is reduced, therefore, the circuit 7 does not reach the stop of an oscillating condition, and the display part 9 displays that mixed air exists, and also, raises an alarm sound.



8: outputting circuit. 10: power source

## (54) TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS METHOD

(11) 63-138250 (A) (43) 10.6.1988 (19) JP

(21) Appl. No. 61-285783 (22) 29.11.1986

(71) AKIRA WADA (72) AKIRA WADA

(51) Int. Cl'. G01N27/26

**PURPOSE:** To effectively remove remaining free radicals by removing a basic radical accelerating agent added to a two-dimensional gel by pre-migration and adding a strong acidic soln. to a negative electrode buffer at the time of analyzing a protein sample by using a bar-shaped gel, one-dimensional gel and two-dimensional gel consisting of polyacrylamide.

**CONSTITUTION:** The sample is subjected to electrophoresis in the bar-shaped gel for a pretreatment and is concd. to prepare a zero-dimension sample gel. This gel is inserted at a desired level position in the one-dimensional gel and is subjected to one-dimensional electrophoresis. The gel subjected to the one-dimensional sepn. to be plated on the top end of the two-dimensional gel and to be subjected to electrophoresis is thereby prep'd. The sample is concd. to assure the effective one-dimensional and further two-dimensional migration so as to avoid encountering of the individual protein molecules in the sample with free radicals by the zero-dimensional migration. The radical capturing agent is migrated in the respective stages and the strong acidic soln. is added to the negative electrode buffer to increase the acidity of the gel.

## (54) ANALYSIS OF PHOSPHORIC ACID ION BY CAPILLARY TYPE

## ISOKINETIC ELECTROPHORESIS METHOD

(11) 63-138251 (A) (43) 10.6.1988 (19) JP

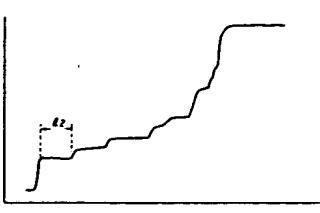
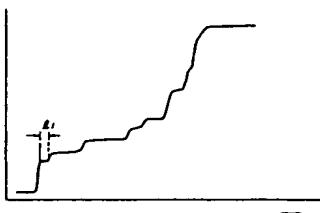
(21) Appl. No. 61-285663 (22) 28.11.1986

(71) SHIMADZU CORP (72) TAKASHI HINE(1)

(51) Int. Cl'. G01N27/26

**PURPOSE:** To measure phosphoric acid ion with high accuracy regardless of the presence or absence of a component having the same mobility as the mobility of the phosphoric acid ion by actin tin ion on a sample to selectively remove the phosphoric acid ion therefrom.

**CONSTITUTION:** A known amt. of phosphoric acid is added to refined SAKE to prepare the sample. Tin ion powder maintained in a dry state is added thereto to prepare the sample which is then analyzed under the migration conditions described as follows: A soln. mixture composed of 0.01mol hydrogen chloride,  $\beta$ -alanine and "Triton X-100\*\*" is used as a leading soln. and the concn. of the hydrogen ion thereof is adjusted to 3.6pH. The isotachogram shown in the figure is obt'd. by using 0.01mol sodium n-caproate and setting migration current at  $100\mu\text{A}$ . On the other hand, a known amt. of phosphoric acid is added to the same fined SAKE to prepare the sample and the sample is analyzed under the same conditions to obtain the isotachogram shown in the another figure. These tachograms are compared and a difference between the migration zone lengths  $l_1$  and  $l_2$  of the phosphoric acid ion is determined, by which the component having the same mobility as the mobility of the phosphoric acid ion is discriminated.



x: time

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-138250

⑬ Int.Cl.\*

G 01 N 27/26

識別記号

厅内整理番号

C-6923-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月10日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全 8頁)

⑮ 発明の名称 二次元電気泳動法

⑯ 特 願 昭61-285783

⑰ 出 願 昭61(1986)11月29日

⑱ 発明者 和田 明 滋賀県大津市比叡平3丁目16番15号

⑲ 出願人 和田 明 滋賀県大津市比叡平3丁目16番15号

⑳ 代理人 弁理士 新実 健郎 外2名

明月 稲田

1. 発明の名称

二次元電気泳動法

2. 特許請求の範囲

(1) 試料成分を一次元ゲル中で電気泳動させ、これにより得られた一次元サンプルゲルを二次元ゲルの上端に載せてさらに電気泳動させることからなる二次元電気泳動法において、

試料を前処理用棒状ゲル中において電気泳動させることにより濃縮して零次元サンプルゲルを作成し、

前記サンプルゲルを一次元ゲル中において切欠かれた所望のレベル位置に挿入して一次元電気泳動を実施し、これにより二次元ゲルの上端に載せてさらに電気泳動させるべき一次元分離ゲルを調製することを特徴とする二次元電気泳動法。

(2) 前記前処理用棒状ゲル及び一次元ゲルが方形断面を有するようにし、これによって、サンプ

ルゲル及び一次元分離ゲルが、それぞれ前記一次元ゲル及び二次元ゲルに対して隙間なく密着するようにしたことを特徴とする特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

(3) いずれもポリアクリラミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、前記各ゲルにおいて対応する試料溶液又はゲルを加えて泳動させる前に、各ゲル中に残存するフリーラジカルを除去するための両電極からなるラジカル捕捉剤を泳動させることにより、各ゲルでの泳動中ににおける試料の、フリーラジカルによる消耗を防止することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項又は第(2)項記載の方法。

(4) 前記一次元ゲルに対するラジカル捕捉剤が2-メルカブトプロピオン酸を含み、前記棒状ゲル及び二次元ゲルに対するラジカル捕捉剤が2-メルカブトエチルアミンを含むものであることを特徴とする特許請求の範囲第(3)項記載の方法。

(5) いずれもポリアクリルアミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、前記各ゲルにおいて対応する試料溶液又はゲルを加えて泳動させると共に強い還元的状態を保つための荷電体からなる還元剤を泳動させることにより、各ゲル中で蛋白分子がS-S架橋し、二量体化することを防止することを特徴とする特許請求の範囲第(1)～(4)項のいずれか1項に記載の方法。

(6) 前記一次元ゲルに対する還元剤が2-メルカプトプロピオン酸を含み、前記棒状ゲル及び二次元ゲルに対する還元剤がシステインを含むものであることを特徴とする特許請求の範囲第(5)項記載の方法。

(7) いずれもポリアクリルアミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、二次元ゲルに添加された塩基性ラジカル促進剤を前泳動によって除去すると共に、負電極バッファーに強酸性液を加えて同ゲルの酸度を高めることにより塩基

性低分子量の小蛋白に対する分離能を向上させることを特徴とする特許請求の範囲第(1)～(6)項のいずれか1項に記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、二次元電気泳動法、特にポリアクリルアミドゲルを用いた蛋白質試料の二次元電気泳動法及びその方法を実施するための装置に関するものである。

#### 従来の技術

従来、試料を一次元ゲル中で電気的に泳動させ、これにより得られた一次元サンプルゲル柱を二次元ゲルの上端に載せて、さらに電気泳動させることからなる二次元電気泳動法において、例えば前記一次元及び二次元ゲルとしてポリアクリルアミドゲルを用い、大腸菌リボソーム蛋白質を分離検出する場合、試料蛋白は溶液として円柱状の一次元ゲルに加えられ、その泳動により成分分離（一次元分離）され、その状態で固定された円柱状ゲルを二次元ゲルの上端に載置し、二次元泳動を行うものであった。

#### 発明が解決しようとする問題点

この場合、泳動前の各ゲル中に残存するフリー

ラジカルは泳動中において試料蛋白を化学変化させ、試料の一部を消耗させてしまうという欠点があった。また、泳動処理中の各ゲルにおいては、システイン残基の酸化により試料中の蛋白分子がS-S架橋し、二量体化して分離されにくくなるという欠点をも有していた。さらに、二次元ゲルに特有の問題として塩基性低分子量の蛋白質は、泳動フロントと重なって濃縮過程が長引き、分離が不十分になるという不都合があった。

また、円柱型の一次元分離済ゲルを、二次元ゲルの上端に置くため、両ゲルの接觸面の両端に隙間ができる、これが泳動の乱れの一因となっていた。

#### 問題点を解決するための手段及び作用

これらの問題点を解決するため、本発明は、試料成分を一次元ゲル中で電気泳動させ、これにより得られた一次元サンプルゲルを二次元ゲルの上端に載せてさらに電気泳動させることからなる二次元電気泳動法において、

試料を前処理用棒状ゲル中において電気泳動さ

せることにより混縫して零次元サンプルゲルを作成し、

前記サンプルゲルを一次元ゲル中において切欠かれた所望のレベル位置に挿入して一次元電気泳動を実施し、これにより二次元ゲルの上端に載せてさらに電気泳動させるべき一次元分離ゲルを調製することを特徴とする二次元電気泳動法を構成したものである。

本発明は、上記の構成において一次元泳動の前段階として言わば零次元泳動を行わせたことにより、試料中の蛋白分子が個々にフリーラジカルと遭遇するのを避けるように試料を混縫し、これにより一次元泳動、さらには二次元泳動の効率的な実施を可能にしたものである。

本発明は、また前記前処理用棒状ゲル及び一次元ゲルが方形断面を有するようにし、これによって、サンプルゲル及び一次元分離ゲルが、それぞれ前記一次元ゲル及び二次元ゲルに対して隙間なく密着するようにしたものである。このようなゲル接続の密着性は、接続面の両端に隙間を生

じ、泳動が乱れるという従来の円柱管内での一次元ゲル調製方式の欠点を完全に解消するものである。

本発明は、さらにいずれもポリアクリルアミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、前記各ゲルにおいて対応する試料溶液又はゲルを加えて泳動させる前に、各ゲル中に残存するフリーラジカルを除去するための荷電体からなるラジカル捕捉剤を泳動させることにより、各ゲルでの泳動中における試料の、フリーラジカルによる消耗を防止するものである。

本発明は、さらにいずれもポリアクリルアミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、前記各ゲルにおいて対応する試料溶液又はゲルを加えて泳動させると共に強い還元的状態を保つための荷電体からなる還元剤を泳動させることにより、各ゲル中で蛋白分子がS-S架橋し、二量体化するのを防止するものである。

本発明は、さらにいずれもポリアクリルアミドからなる前記棒状ゲル、一次元ゲル及び二次元ゲルを用いて蛋白試料を分析するにあたり、二次元ゲルに添加された塩基性ラジカル促進剤を前泳動によって除去すると共に、負電極バッファーに強酸性液を加えて同ゲルの酸度を高めることにより塩基性低分子量の小蛋白に対する分離能を向上させるものである。

#### 実施例の説明

##### 零次元泳動

ここにいう零次元泳動とは、一次元泳動において一次元ゲルに試料溶液を注入する代わりに同ゲル中に挿入されるサンプルゲルを電気泳動法により混縫形成する処理のことである。この零次元泳動は、第1図(a)に示すような角柱状のゲル室(1)を、一列又は二列以上形成したゲルコンテナGC<sub>0</sub>を上部バッファー槽(2)及び下部バッファー槽(3)間に接着し、ゲル室(1)内には、例えば蛋白試料の泳動媒体としてポリアクリルアミドゲルを収容し、その上部より試料溶液を導入して行

うものである。この場合、上部バッファー槽(2)に設けられた陽極A及び下部バッファー槽(3)に設けられた陰極B間に適当な電圧が印加される。この泳動前においてポリアクリルアミドゲルにはラジカル捕捉剤としての2-メルカブトエチルアミンを前泳動させ、これによって試料蛋白の消耗を防止できるようになっている。また、前記試料溶液の泳動中においては、還元剤としてのシステインも共に泳動させ、これによって前記蛋白分子のS-S架橋を防止するものである。このようにして泳動混縫された試料はゲルコンテナGC<sub>0</sub>から摘出又はそのコンテナの解体により取出された後、その混縫ゲル部分(4)の適当部位を切り取って一次元ゲルのためのサンプルゲル片SGとする。

なお、この零次元泳動に用いられた上部バッファー槽(2)及び下部バッファー槽(3)は次に述べる一次元泳動用の上部バッファー槽及び下部バッファー槽とそれぞれ同様な構造を有するものであり、零次元泳動は試料を混縫するため、一次

元泳動よりも全長の短いゲルコンテナを用いたことが機構上の唯一の相違点である。ゲルコンテナ G C<sub>1</sub> の両板間の距離、すなわちゲルの厚みはこの場合約 3 mm としたが、1 mm 程度から 3 mm を越えるものまでその用途に応じて、作成することができる。一次元泳動及び二次元泳動のゲル厚についても同様である。

#### 一次元泳動

一次元泳動用ゲルコンテナ G C<sub>1</sub> は第2図(a)に示すような角柱状、すなわち矩形断面をもった複数列のゲル室(10)を有すると共に、一側面の比較的高レベル位置において各ゲル室(10)に通ずるサンプル挿入窓(11)を形成したものである。前記零次元処理によるサンプルゲル片は、この窓の縦寸法よりやや低い高さを有するが、零次元及びこの一次元のゲル室幅及び奥行は同じであるため、この窓からゲル室(10)に挿入された各サンプルゲル片 S G は、同室内の泳動用ポリアクリラミドゲルにおけるこの窓に対応した切除部に入り、その上下切断端の全面によく密着する。第2図(b)

に示す S G C はサンプルゲルカバー板であり、前記ゲルコンテナ G C<sub>1</sub> の各窓(11)に対応する複数の窓枠(12)を有するものである。各窓枠(12)は対応する各窓(11)内に挿入され、これによりゲル室(10)内において対応する位置にあるサンプルゲル片 S G の側面を支持及び被覆するものである。サンプルゲルカバー S G C を接着したゲルコンテナ G C<sub>1</sub> は第3図に示すように、その上端及び下端を上部バッファー槽 A B V<sub>1</sub> 及び下部バッファー槽 C B V<sub>1</sub> に接着し、陽極 A 及び陰極 C 間に適当な電圧を印加することにより、サンプルゲルの泳動分離を行うものである。ゲルコンテナ G C<sub>1</sub> へのサンプルゲルカバー S G C の接着は、例えば第4図に示すようなクリップ(13)を用いて行われる。また、上部バッファー槽 A B V<sub>1</sub> 及び下部バッファー槽 C B V<sub>1</sub> の内部構造も同じく第4図に示す通りである。

上記の一次元泳動におけるポリアクリラミドゲルは、サンプルゲル片 S G の挿入前において、ラジカル捕捉剤としての 2-メルカブトプロピオ

ン酸を前泳動させたものであり、さらに前記サンプルゲルの泳動中においては還元剤としてラジカル捕捉剤と同じ 2-メルカブトプロピオン酸が同時に泳動処理され、ゲル中を強い還元状態に維持するようになっている。

上記のようにサンプルゲル片を一次元ゲルとは別に作成し、これを一次元ゲル中に挿入する方式は本発明においてのみ採用された独自の方式であり、これによってラジカル捕捉剤の前泳動処理と相俟って残存ラジカルによる試料消耗の問題が解決したものである。

#### 二次元泳動

二次元泳動のゲルコンテナは、第5図に示すような 3 種類のゲルコンテナ板 L P、M P、R P を組み合わせ、これにより形成したゲルコンテナ構体を上下バッファー槽と接続することにより行われる。二次元ゲル室は複数枚用いた場合の M P・M P 板面間及び左側コンテナ板 L P の右側面とこれに対応するコンテナ板 M P の左側面並びに、右側コンテナ板 R P の左側面とこれに対応するコン

テナ板 M P の右側面との間に形成される。

コンテナ構体 G C<sub>2</sub> と上部バッファー槽 A B V<sub>2</sub> 及び下部バッファー槽 C B V<sub>2</sub> を組み合わせた構造の断面は第6図に示す通りであり、各ゲル室には上端に一次元泳動済ゲルを載置できるだけの余裕を残して二次元泳動用ゲル B G が挿入される。コンテナ板 M P の上端にはスロット D<sub>1</sub> が形成されると共に、左側コンテナ板 L P 及び右側コンテナ板 R P の上端外側面と上部バッファー槽 A B V<sub>2</sub> の下端に形成された突起との間には同様なスロット D<sub>2</sub> が形成される。コンテナ構体 G C<sub>2</sub> の各ゲル室の上端からは一次元泳動済ゲル S G<sub>2</sub> が挿入されると共に、コンテナ構体 G C<sub>2</sub> の上端にはガーゼが当てがわれ、各スロット D<sub>1</sub> 及び D<sub>2</sub> にはガーゼ G の上から平板くさび P W が挿入され、これにより緊張されるガーゼにより一次元泳動済ゲル S G<sub>2</sub> の上側線が押圧され、二次元泳動用ゲル B G の上端と好ましく密着するようになっている。

第7図はコンテナ構体 G C<sub>2</sub> を維持するための結合部材 H 及び上部バッファー槽 A B V<sub>2</sub> 及び下

部バッファー槽CBV<sub>2</sub>の内部構造が示されている。

この二次元泳動においても、泳動媒体であるポリアクリルアミドゲルには試料ゲル柱SG<sub>2</sub>成分の泳動前において、ラジカル捕捉剤としての2-メルカプトエチルアミンを泳動させることにより残存するフリーラジカルを除去し、また試料ゲル柱成分の泳動中においては、電荷をもった還元剤としてシステインを共に泳動させ、二次元ゲル内を強い還元的状態に維持するようにした。同時に、前泳動で同ゲル内の塩基性ラジカル促進剤を除去すると共に、下部、すなわち負電極バッファー槽CBV<sub>2</sub>には塩酸を加えることにより、ゲルのpHを通常の4.5から約0.9低下させて3.6となるようにした。

第8図は本発明の方法を実施して得られた試料蛋白の分子量と泳動距離との関係を示すグラフである。この場合、移動度に対する電荷の効果の差を消去すれば、分子量の対数値はほぼ完全に移動度に比例しており、分子量の測定が可能となった

6.0.4.0.3及び0.1の値を得たものである。

#### 発明の効果

本発明の方法は、以上の如く構成されたため、各泳動用ゲル内に残存するフリーラジカルを効果的に除去すると共に、いわゆる零次元泳動法の実施による試料の濃縮に基づいてフリーラジカルの影響（試料の消耗）を防止し、さらにゲル内を還元状態に保つことにより試料蛋白が従来の方法の如く還元型と酸化型の2つのスポットに分裂するなどの不都合や、S-S架橋による二量体化を防止し、定量性及び分解能を向上させたものである。また、二次元ゲル内のpHを通常の状態より低下させたことにより、移動度の大きい塩基性低分子量の蛋白質が泳動フロントと重なって分離にくくなるという欠点を改良したものである。この結果、本発明においては、試料蛋白の分子量の対数値と泳動度とが満足すべき比例関係を示すようになった。

ことを示している。

上記第8図のグラフ及び第9図に示した二次元ゲルの分離モデルから明らかな通り、二次元ゲルの塩基性領域からは、既知のスポット以外に4個の未知の蛋白質によるスポット（A、B、C、D）が検出された。第9図において、スポットAはL33の右下に、スポットBはL34の左下に、スポットCはL29とL27の中間に、そしてスポットDはL32の直下において見いだされる。なお、A、B、Cは50S亜粒子に、Dは30S亜粒子に存在する。なお、還元剤を用いずに、本発明の方法を実施した場合には、スポットA、B、Cが消失するが、BとCの消失に伴ってその近傍にスポットB'・とC'が見いだされた。一方、Dは還元剤の有無と無関係に同一位置においてスポットを形成する。

また、A、B、C、Dの分子量を二次元移動度を用いて求めると、それぞれ6400、4900、8200及び5900となった。なお、<sup>14</sup>Cアミノ酸標識によってコピー数を測定し、それぞれ0.

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図(a)及び(b)はそれぞれ本発明の零次元泳動用ゲルコンテナ及びその使用状態を示す縦断面図。

第2図(a)及び(b)はそれぞれ一次元泳動用ゲルコンテナ及びサンブルゲルカバーを示す斜視図。

第3図は一次元泳動用ゲルコンテナ及びこれに接着された上下電極槽を示す縦断面図。

第4図はその分解斜視図。

第5図は二次元泳動用の各種ゲルコンテナ板を分離して示す斜視図。

第6図は第5図のゲルコンテナ板を組み合わせてコンテナ構体とし、これに上下電極槽を接着した構造を示す縦断面図。

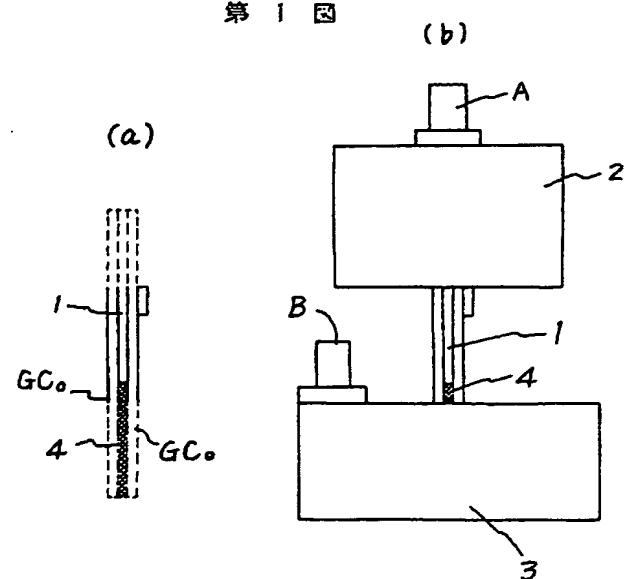
第7図はその分解斜視図。

第8図は本発明の方法により得られた分子量・泳動距離特性を示すグラフ。

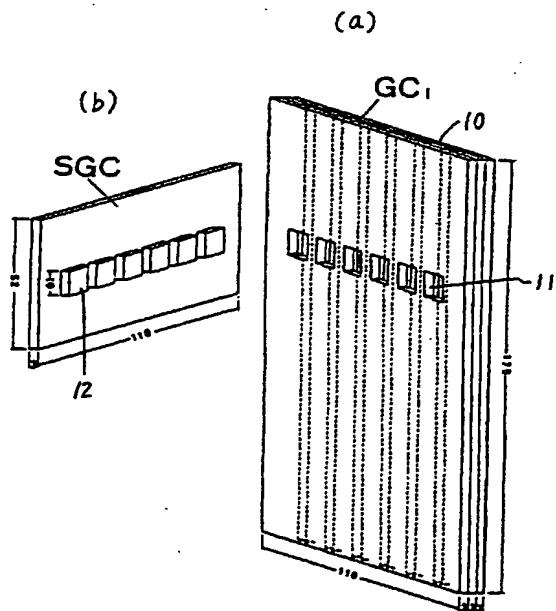
第9図は二次元ゲルの分離モデルを示す図である。

(1) ..... ゲル室  
 (2) ..... 上部(陽極)バッファー槽  
 (3) ..... 下部(陰極)バッファー槽  
 (4) ..... 移動用ゲル  
 A ..... 陽極  
 B ..... 陰極  
 S G ..... サンプルゲル  
 S G C ..... サンプルゲルカバー  
 A B V ..... 上部(陽極)バッファー槽  
 C B V ..... 下部(陰極)バッファー槽  
 L P ..... 左側コンテナ板  
 M P ..... 中央コンテナ板  
 R P ..... 右側コンテナ板  
 D ..... コンテナ間のスロット  
 G ..... ガーゼ  
 P W ..... 平板くさび  
 G S ..... ゲルスペーサ  
 H ..... 締結具

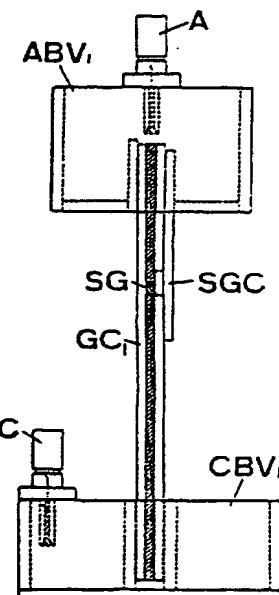
第 1 図

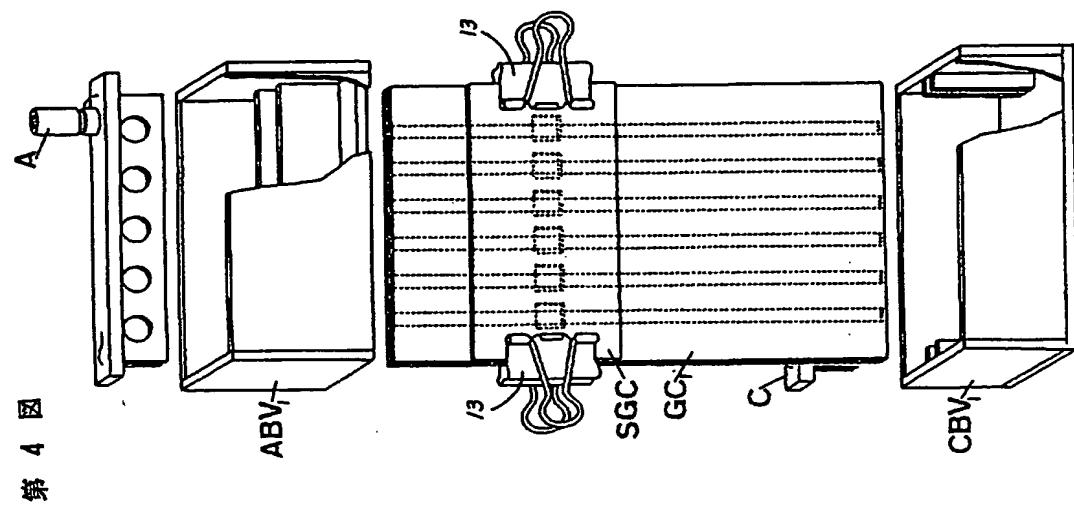


第 2 図



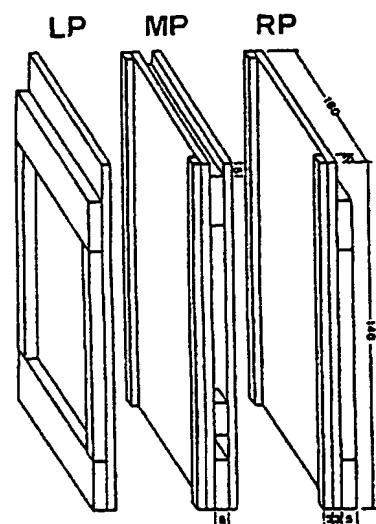
第 3 図



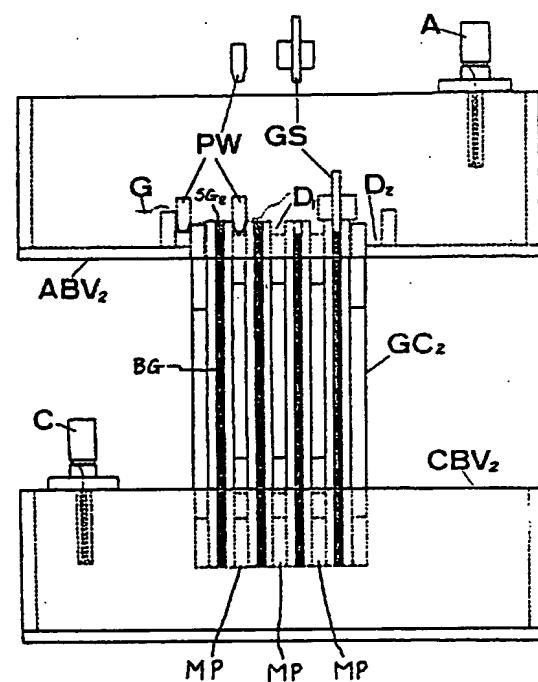


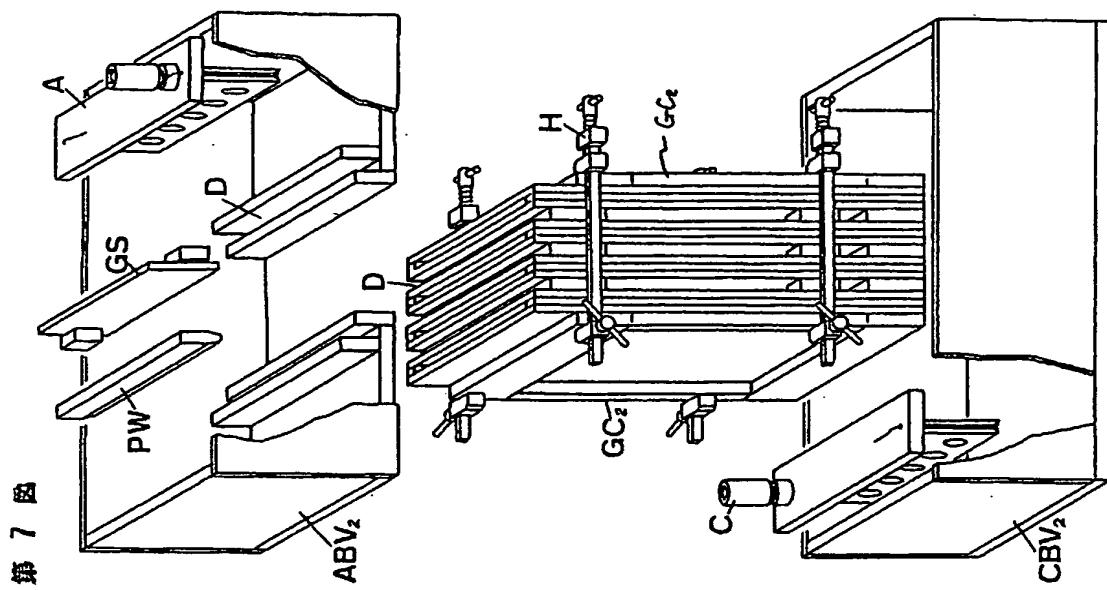
第4図

第5図



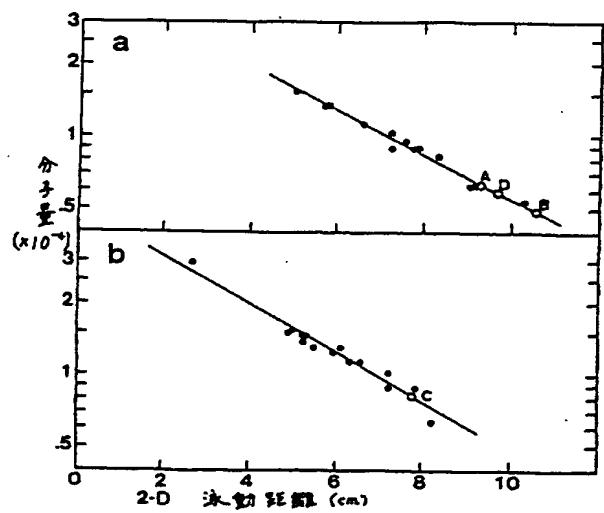
第6図





第7図

第8図



第9図

